

## ALTERAÇÕES DE PERMEABILIDADE ENCEFÁLICA E NO PERFIL DE AQUAPORINAS NO MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁCIDO VALPROÍCO

Marília Körbes Rockenbach<sup>1,2,3</sup>, Iohanna Deckmann<sup>1,2,3</sup>, Mellanie Fontes-Dutra<sup>1,2,3</sup>, Gustavo Brum Schwingel<sup>1,2,3</sup>, Júlio Santos-Terra<sup>1,2,3</sup>, Victorio Bambini-Junior<sup>2,3,4</sup>, Carmem Gottfried<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, UFRGS; <sup>2</sup>Grupos de Estudos Translacionais do Transtorno do Espectro Autista (GETTEA), UFRGS; <sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação (INCT-NIM), Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; <sup>4</sup>School of Pharmacy and Biomedical Sciences, Faculty of Clinical and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire – United Kingdom;

### INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem no neurodesenvolvimento caracterizado por (1) prejuízos na comunicação e interação social, e (2) comportamentos repetitivos e estereotipados<sup>[1]</sup>. Dentre as alterações clínicas encontradas em pacientes com TEA, observa-se o aumento do volume encefálico nos primeiros anos de vida<sup>[2]</sup>. Embora a etiologia do TEA permaneça desconhecida, evidências apontam para uma interação entre fatores genéticos e ambientais; dentre esses, destaca-se a exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA).

### OBJETIVOS

Avaliar a permeabilidade de barreiras encefálicas e a expressão e a localização das aquaporinas (AQP) 1, 4 e 9 em diferentes regiões encefálicas no modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA.

### METODOLOGIA

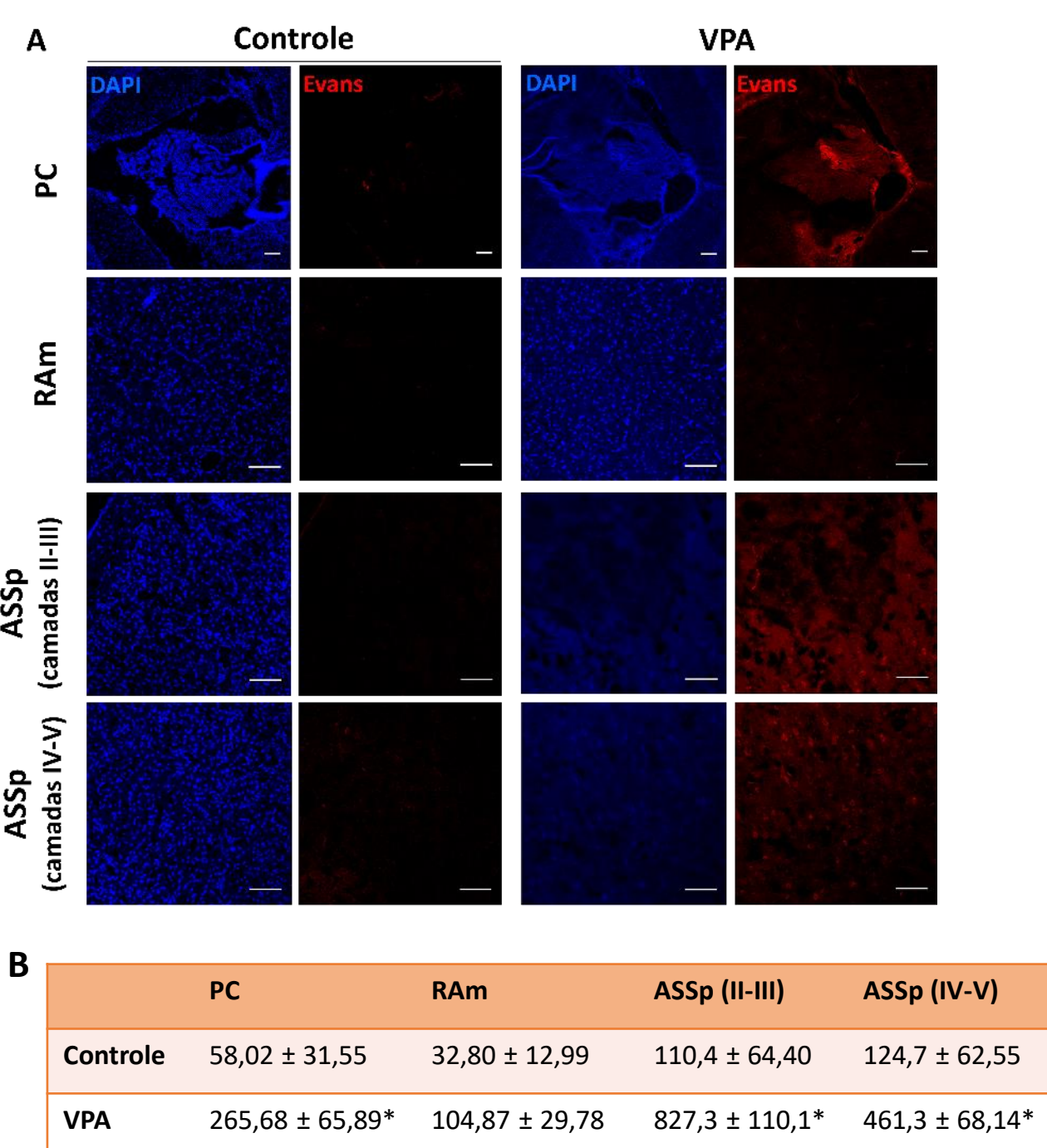
Ratas Wistar prenhes (CEUA-HCPA 130047) receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de 600 mg/kg de VPA ou de solução salina 0,9% no dia embrionário 12,5<sup>[3-7]</sup>. Filhotes machos de 30 dias foram eutanasiados e foram feitas as análises A, B e C.

**A) Permeabilidade encefálica ao corante azul de Evans:** os animais foram injetados via i.p. com uma solução de azul de Evans 2% e, após 2h, anestesiados e perfundidos (via transcardíaca) para remoção do encéfalo e cortes histológicos para visualização em microscópio de fluorescência (n=4). **B) Imunofluorescência:** os animais foram anestesiados e perfundidos (via transcardíaca) para a análise de AQP1 e AQP4 (n=3-5) no plexo coroide (PC), na região da amígdala (RAM) e na área somatossensorial primária (ASSp)<sup>[5]</sup>. **C) Western Blotting:** após sobredose anestésica seguida por decapitação, a RAM e a ASSp foram dissecadas para a análise do imunoconteúdo de AQP1, AQP4 e AQP9 (n=4)<sup>[7]</sup>.

### RESULTADOS

#### A) Permeabilidade encefálica ao azul de Evans

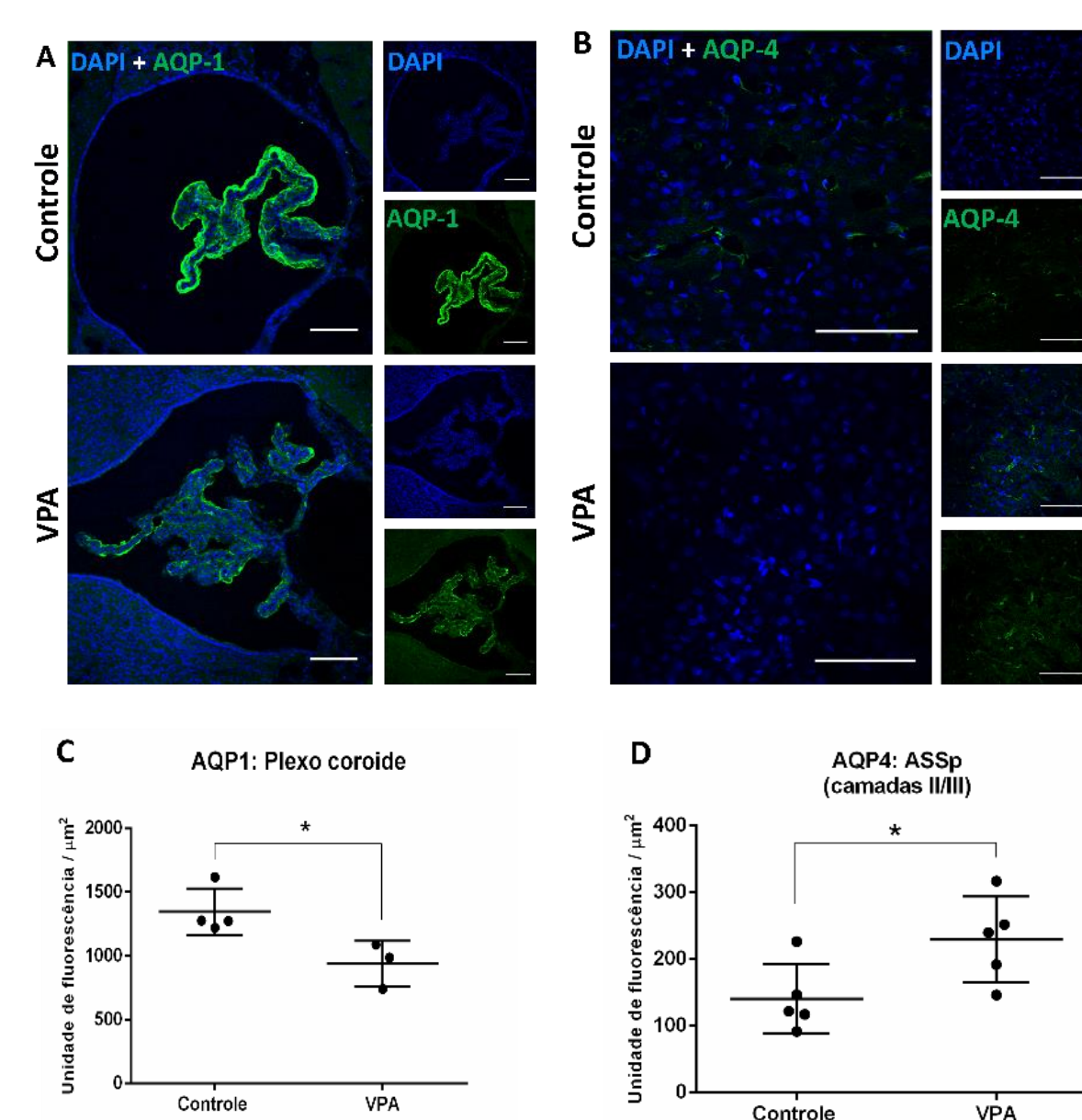
O grupo VPA mostrou aumento na permeabilidade no PC (p=0,0295) e na ASSp (camadas II-III, p= 0,0014, e camadas IV-V, p=0,0108). Houve tendência de aumento na RAM no grupo VPA (p= 0,0684).



**Figura 1. Permeabilidade da barreira hematoencefálica ao corante azul de Evans.** A. Imagens representativas de plexo coroide (PC), região da amígdala (RAM), área somatossensorial (ASSp) – camadas II-III e camadas IV-V. Barra de escala: 100 µm. B. Quantificação da fluorescência (ImageJ). N = 4. Teste t de Student \*p<0,05.

#### B) Imunofluorescência

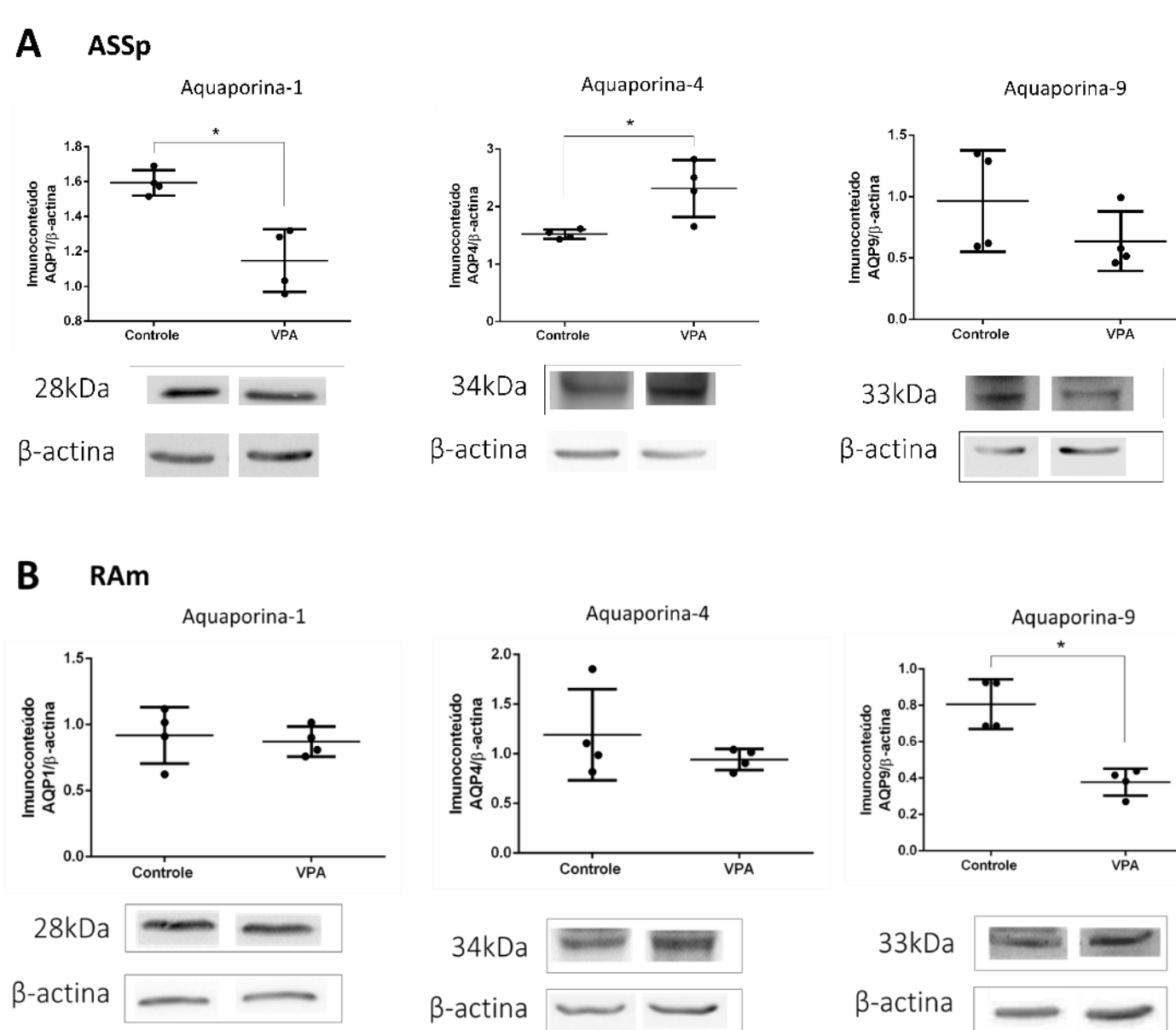
Houve um decréscimo de AQP1 no PC (p= 0,0317) e um aumento de AQP4 nas camadas II-III da ASSp (p= 0,0433) no grupo VPA. Não houve diferença na expressão de AQP4 no PC, na RAM e nas camadas IV/V da ASSp.



**Figura 2. Distribuição de aquaporinas (AQP) 1 e 4 em diferentes regiões encefálicas.** Imagens representativas da marcação imunofluorescente de (A) AQP1 em plexo coroide (PC) e de (B) AQP4 em área somatossensorial (ASSp - camadas II/III). (C-D) Quantificação da marcação imunofluorescente de AQP1 e AQP4, respectivamente. Barra de escala: 40 µm. Os valores são mostrados como média ± erro padrão. Análise estatística: teste t de Student. N = 4-5. \*p<0,05.

#### C) Western Blotting

Houve redução do imunoconteúdo de AQP1 (p= 0,0038) e aumento de AQP4 (p= 0,0193) na ASSp no grupo VPA. Já na RAM, houve diminuição do imunoconteúdo de AQP9 no grupo VPA (p= 0,0015).



**Figura 3. Imunoconteúdo de aquaporinas (AQP) 1, 4 e 9 em diferentes regiões encefálicas.** Imagens representativas de *immunoblotting* para AQP 1, 4 e 9 e análises quantitativas são mostradas respectivamente para (A) área somatossensorial (ASSp) e (B) Região da amígdala (Ram). Os valores são mostrados como média ± erro padrão. Análise estatística: teste t de Student. N = 4. \*p<0,05.

### REFERÊNCIAS

[1] Associação Americana de Psiquiatria. DSM-5 [2] Emers on RW. et al., Sci. Transl. Med. 2017, Jun 7;9(393). pii: eaag2882 [3] Bambini-Junior V. et al., Brain Research. 2011, 1408(0):8-16. [4] Schneider, T. et al. Neuropsychopharmacology. 2005. 30, pp. 80–89. [5] Fontes-Dutra et al., Frontiers in Synaptic Neuroscience. 2018, v. 10, p. 1-12. [6] Hirsch et al., Food and Chemical Toxicology. 2018 v. 115, p. 336-343, 2018. [7] Bistrot R. et al., Brain Research. 2013, 1495, 52-60

### AGRADECIMENTOS

### DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Ainda não se conhece o mecanismo pelo qual o edema e o maior volume encefálico são formados em pacientes com TEA; dessa forma, surgem as AQP com possível papel mediador dessa alteração. **Concluimos que a exposição pré-natal ao VPA altera tanto o perfil de AQP quanto a permeabilidade encefálica, observada pelo aumento da fluorescência tecidual do corante azul de Evans.** Estes dados são importantes para compreender os mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TEA, permitindo traçar paralelos com alterações comportamentais que caracterizam este transtorno, evidenciando possíveis alvos terapêuticos.